

## 齐墩果酮酸靶向 TRAF1 调控 Cullin NEDD8 修饰的作用及机制研究

张议元<sup>1</sup>, 王甜甜<sup>1</sup>, 徐宇<sup>1</sup>, 王子叶<sup>1</sup>, 程石<sup>2</sup>, 屈祎<sup>1</sup>, 张雪<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 2. 浙江大学爱丁堡大学国际联合学院, 浙江 海宁 314400)

**摘要:** 课题组前期发现天然五环三萜甾体通酸调控 Cullin2 的 NEDD8 修饰, 本研究旨在发现更多的靶向 Cullin 家族成员的三萜类天然活性分子, 并揭示其作用机制。利用 Western blot 技术检测能显著改变细胞内总蛋白 NEDD8 修饰以及特异性 Cullin 蛋白 NEDD8 修饰的天然产物; 利用微量热泳动 (microscale thermophoresis, MST) 技术检测候选小分子齐墩果酮酸与 TRAF 家族蛋白的直接结合, 并通过细胞热转移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA) 验证其在活细胞水平的结合情况; 利用邻近连接技术 (proximity ligation assay, PLA) 考察齐墩果酮酸对肿瘤坏死因子受体相关因子 1 (TNF receptor-associated factor 1, TRAF1) 与 Cullin1 的 NEDD8 修饰复合物间的蛋白互作的调控作用。结果发现了 3 个显著抑制细胞内 NEDD8 修饰的五环三萜小分子, 其中齐墩果酮酸阻断 NEDD8 修饰的作用最强。与前期鉴定的甾体通酸调控 Cullin2/5 不同, 齐墩果酮酸还能特异性诱导 NEDD8 修饰的 Cullin1 转变为无修饰形式。结合实验表明, 齐墩果酮酸能在细胞裂解液及活细胞水平与 TRAF1 直接结合; 进一步的机制研究发现, 齐墩果酮酸显著改变 TRAF1 与 Cullin1 NEDD8 修饰复合物间的蛋白互作。以上结果表明, 齐墩果酮酸靶向 TRAF1 并调控其与 NEDD8 修饰复合物互作来抑制 Cullin 的 NEDD8 修饰。

**关键词:** 三萜类; 齐墩果酮酸; TRAF1; Cullin; NEDD8 修饰

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1414-07

## The effect and mechanism of oleanonic acid targeting TRAF1 in regulating Cullin NEDD8 modification

ZHANG Yi-yuan<sup>1</sup>, WANG Tian-tian<sup>1</sup>, XU Yu<sup>1</sup>, WANG Zi-ye<sup>1</sup>, CHENG Shi<sup>2</sup>, QU Yi<sup>1</sup>, ZHANG Xue<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. ZJU-UoE Institute, Zhejiang University, Haining 314400, China)

**Abstract:** In the early stage of the project, it was found that natural pentacyclic triterpenes liquidambaric acid regulates the NEDD8 modification of Cullin2. This study aims to find more triterpenoid natural active molecules targeting Cullin family members and reveal its mechanism of action. Western blot was used to detect natural products that can significantly change the total protein NEDD8 modification and specific Cullin protein NEDD8 modification in cells; microscale thermophoresis (MST) was used to detect the direct binding of candidate small molecule oleanonic acid to TRAF family proteins, and the binding at the level of living cells was verified by cellular thermal shift assay (CETSA). Proximity ligation assay (PLA) was used to investigate the regulatory effect of oleanonic acid on the protein interaction between TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) and Cullin1 NEDD8 modified complex. Three pentacyclic triterpenoids were found to significantly inhibit NEDD8 modification in cells, among which oleanonic acid had the strongest effect on blocking NEDD8 modification. Different from the previous identification that liquidambaric acid regulates Cullin2/5, oleanonic acid can also specifically induce NEDD8-modified Cullin1 to transform into its unmodified form. And binding experiments

收稿日期: 2025-01-09; 修回日期: 2025-02-28.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82204430).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322419, E-mail: xuezhang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0027

showed that oleanonic acid could directly bind to TRAF1 at the level of cell lysate and living cells. Further mechanism studies found that oleanonic acid significantly changed the protein interaction between TRAF1 and Cullin1 NEDD8 modified complex. The above results indicate that oleanonic acid targets TRAF1 and regulates its interaction with NEDD8 modification complex to inhibit NEDD8 modification of Cullin.

**Key words:** triterpenoid; oleanonic acid; TRAF1; Cullin; NEDD8 modification

蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 是指将特定的化学基团或蛋白共价偶联到蛋白质的一个或者多个氨基酸上的生物学过程, 具有调控蛋白构象、理化性质和生物学功能的作用, 常见修饰如磷酸化、乙酰化、泛素化和类泛素化修饰等<sup>[1]</sup>。与泛素化修饰 (ubiquitination) 类似, 类泛素 NEDD8 修饰也是由 E1/E2/E3 三级酶联反应催化的 NEDD8 分子共价连接到蛋白底物的赖氨酸残基上的过程; 简而言之, ATP 作用下, NEDD8 分子被 E1 酶 NAE 激活后转移至 E2 偶联酶 UBC12 或 UBE2F<sup>[2-4]</sup>, 最后在 E3 连接酶 RBX1 作用下, NEDD8 分子从 E2 酶转移至靶蛋白<sup>[5]</sup>。目前, 大量研究已经证实 NEDD8 修饰在多种生物学过程如蛋白降解中发挥重要作用, 其异常调控尤其是过度激活直接关联包括癌症、纤维化疾病及神经退行性疾病等的发生发展<sup>[6,7]</sup>, 因此, 靶向 NEDD8 修饰是肿瘤等相关疾病的一种潜在治疗途径。

现有研究表明, NEDD8 修饰最为主要和最重要的底物是 Cullin 家族蛋白。真核细胞中 Cullin 家族包含了 Cullin1~3、Cullin4A、Cullin4B、Cullin5 和 Cullin7 共 7 个成员, 其与 RING ligases 共同构成了泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 最大的 E3 泛素连接酶家族<sup>[8]</sup>, 调控细胞内约 20% 蛋白的泛素化降解, 因此, Cullin-RING ligases (CRLs) 对细胞维持其稳态和正常功能至关重要, 其功能异常与肿瘤等密切相关。值得注意的是, CRLs 功能主要受支架蛋白 Cullin NEDD8 修饰的调控<sup>[9]</sup>, NEDD8 修饰使 Cullin 蛋白构象显著变化, 从而引起 CRLs 呈开放构象以便底物的进入。Cullin 蛋白的 NEDD8 修饰在细胞生物学中具有多方面的重要意义, 包括激活 CRLs、调控细胞周期、信号传导、蛋白质稳态等。事实上, CRLs 在许多人类疾病中都受到异常调控, 靶向 CRLs NEDD8 修饰已成为临床试验中有效的抗癌靶点<sup>[10]</sup>。然而, 尽管 NEDD8 E1 酶抑制剂 MLN4924 已进入急性髓系白血病和多发性骨髓瘤的临床试验<sup>[9,11,12]</sup>, 但其已显现出不良反应及“脱靶”效应<sup>[13]</sup>, 这可能与其强效且无选择性的 NEDD8 修饰抑制作用相关。因此, 发现具有选择性的 NEDD8 抑制剂, 尤其是特定 Cullin 蛋白的 NEDD8 修饰抑制剂, 可能是提高选择性、减少毒副作用的有效方式。

课题组前期发现一个天然小分子路路通酸 (liquidambaric acid, LDA) 靶向肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2) 选择性抑制 Cullin2/5 的 NEDD8 修饰<sup>[4]</sup>。在此基础上, 本研究筛选出了路路通酸类似物齐墩果酮酸 (oleanonic acid, OA), 其除了能够调控 Cullin2/5 NEDD8 修饰外, 还能够特异性诱导 NEDD8 修饰的 Cullin1 转变为其无修饰形式, 进一步的机制研究发现, 不同于路路通酸, 齐墩果酮酸是通过靶向 TRAF1 调控其与 Cullin1 NEDD8 修饰复合物间的蛋白互作来实现此功能。本研究发现不仅为靶向调控 NEDD8 修饰的小分子增添了新一类抑制剂, 还进一步拓展了 TRAF 家族的潜在功能, 为 NEDD8 修饰领域的研究以及中药活性成分齐墩果酮酸的进一步研发提供一定指导意义。

## 材料与方法

**细胞株** 结肠癌细胞 SW480 和 HCT116 购自美国 ATCC 公司, 人胚胎肾细胞 HEK293T 购自中国科学院细胞库。抗体: NEDD8 (货号: ab126758)、Cullin1 (货号: ab75817)、Cullin2 (货号: ab166917)、Cullin3 (货号: ab75851)、Cullin4A (货号: ab92554) 和 Cullin5 (货号: ab184177) 均购自英国 Abcam 公司; TRAF1 (货号: 4715S, 用于 PLA)、NEDD8 E2 结合酶 (NEDD8-conjugating enzyme Ubc12, UBC12) (货号: 75817, 用于 PLA; 货号: 5641) 和 RIPA 裂解液均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Cullin4B (货号: 12916-1-AP)、TRAF1 (货号: 26845-1-AP)、TRAF2 (货号: 67315-1-Ig) 均购自美国 Protein Technology 公司; 环指状结构域蛋白 1 (RING-box protein 1, RBX1) (货号: sc393640, 用于 PLA)、UBC12 (货号: sc390064, 用于 PLA) 和 NEDD8 (货号: sc373741, 用于 PLA) 均购自美国 Santa Cruz 公司; GAPDH 与  $\alpha$ -tubulin 均购自武汉三鹰生物技术公司。路路通酸类似物库与 1,10-菲罗啉 (*o*-phenanthroline, OPT) 购自美国 MedChemExpress 生物科技公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 和胎牛血清均购自德国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 青霉素-链霉素溶液购自美国 Invitrogen 公司; 蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、

磷酸酶抑制剂、M-PER 裂解缓冲液和 Lipofectamine 3000 均购自美国 Thermo Scientific 公司; *N*-乙基马来酰亚胺 (*N*-ethylmaleimide, NEM) 购自上海毕得医药公司; 4% 多聚甲醛溶液、Triton X-100、5×SDS 上样缓冲液、磷酸缓冲盐溶液、Western 一抗稀释液和 Hoechst 33342 均购自上海碧云天生物技术公司。

**细胞培养** 所有细胞在含有 1% (v/v) 青霉素-链霉素和 10% (v/v) 胎牛血清的培养基中生长。HEK293T、HCT116 和 SW480 细胞系均在 37 °C、5% 二氧化碳的加湿培养箱中培养。所有实验均采用无支原体细胞进行。

**Western blot 实验** 收集指定处理后的细胞, 用 PBS 洗去残留, 在含有 PMSF、蛋白酶和磷酸酶抑制剂、NEM 和 OPT 的 RIPA 缓冲液中裂解, 置于冰上裂解 30 min 后, 放入 4 °C 离心机, 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清进行定量。根据蛋白上清的浓度取适量的蛋白加入 5×SDS 上样缓冲液, 在 100 °C 金属浴中变性 10 min, 最后得到样品。样品通过 SDS/PAGE 凝胶进行电泳, 并转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 膜依次与一抗和二抗孵育, 最后用化学发光法检测条带。

**CRISPR/Cas9 敲除实验** sgRNA 构建: 在 TRAF2 蛋白编码区侧翼设计两个小向导 RNA (sgRNA1 和 2), sgRNA 寡核苷酸序列为: TRAF2 sgRNA1-F: CACCGCAGGCGGAGCACAGGTACT; TRAF2 sgRNA1-R: CACCGCAGGCGGAGCACAGGTACT; TRAF2 sgRNA2-F: CACCGATGGCATCGTCCCGCACGT; TRAF2 sgRNA2-R: AAACACGTGCGGGACGATGCCATC。合成引物经磷酸化, 退火后线性化, 去磷酸化, 得到靶向引物与线性化载体的连接产物, 成功构建 TRAF2 敲除的载体质粒。随后将敲除 TRAF2 的质粒对共转染至 HCT116 细胞中, 转染 48 h 后, 利用流式分选技术收集 GFP 富集的细胞, 以每孔一个细胞的密度铺在 96 孔板中。为筛选缺失克隆, 将 96 孔板中的单克隆分成两部分别进行 PCR 和传代培养。通过 DNA 测序和 Western blot 实验进一步证实了阳性克隆。

**微量热泳动 (microscale thermophoresis, MST)** 在 HEK293T 细胞中分别过表达 GFP 蛋白和带有 GFP 标签的目的蛋白, 一般转染 48 h 待绿色荧光达到 70% 及以上时收取细胞, 用含蛋白酶抑制剂的 M-PER 裂解液裂解, 超声破碎仪辅助破碎蛋白提高得率 (功率: 70 W, 时间: 3 min); 随后冰上裂解 30 min, 样品在 4 °C 下以 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清定量并按照一定比例稀释, 利用微量热泳动仪检测蛋白稀释后的荧光值, 选取荧光值在 200~400 的蛋白稀释倍数, 将蛋白按照比例稀释以备用。用含 10% DMSO 的 PBS 溶液将小

分子梯度稀释, 浓度从 100 μmol·L<sup>-1</sup> 梯度稀释 16 组, 每组留 5 μL 小分子溶液, 随即与前面稀释的蛋白同时孵育, 最后按照小分子梯度稀释顺序放入 MST 仪进行检测, 仪器设置条件: 25 °C, 20% LED 功率, 10% IR-激光功率; 最后用 Nano Temper 软件计算  $K_d$  值。

**细胞热转移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA)** 收集细胞前, HCT116 细胞用 DMSO 或齐墩果酮酸 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 孵育 1 h, 用含有蛋白酶抑制剂的预冷 PBS 进行裂解, 即刻每组平均分成 7 管, 在预设好的温度梯度上孵育 2 min, 随后进行 3 次冻融循环。每个循环, 试管暴露在液氮中 3 min, 然后在 25 °C 下保持 3 min。最后在 4 °C 下以 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 转移上清液进行变性, 用于 Western blot 实验。

**邻近连接技术 (proximity ligation assay, PLA)** 按照 Sigma-Aldrich (DUO092101) 提供的方案进行。简单地说, 细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/450 μL 的密度接种到共聚焦皿中, 细胞贴壁后给药。细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 室温通透 15 min, 接着细胞在 37 °C 的 Duolink<sup>®</sup> 阻断液中封闭 1 h, 并与两种一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后, 样品分别用 PLA 探针和连接溶液孵育 1 h 和 30 min, 接着在 37 °C 下扩增 100 min。细胞核用 Hoechst 染液在室温下染色 10 min。图像是使用连接在 LEICA SP-8 显微镜上的 LEICA 应用程序套件 X 软件捕获的。PLA 中的一抗和稀释度如下: TRAF1 (1:50), TRAF2 (1:100), NEDD8 (1:50), Cullin1 (1:50), UBC12 (Cell Signaling, 1:50), RBX1 (1:50)。

**统计学方法** 所有数据统计分析均采用 GraphPad Prism 软件, Adobe illustrator 软件进行排版。对于两组的比较, 采用非配对、双尾 *t* 检验。对于多组与一个对照组的比较, 采用单因素方差分析 (ANOVA)。*P* < 0.05 被认为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 调控蛋白 NEDD8 修饰的三萜类天然产物的发现

课题前期发现五环三萜类路路通酸能够调控细胞内总 NEDD8 修饰, 为发现更多调控 NEDD8 修饰的天然小分子, 本研究以路路通酸类似物为基础, 收集了 52 个与其结构相似的五环三萜类化合物; 首先通过 Western blot 检测了对细胞内总 NEDD8 修饰的调控作用, 结果显示, 包括路路通酸在内, 共有 11 个小分子呈现出较强的调控蛋白 NEDD8 修饰的作用 (图 1A、B); 进一步的验证确定了 5 个候选小分子能够显著消除蛋白 NEDD8 修饰 (图 1C); 其中有 3 个五环三萜类小分子: 3-表熊果酸 (3-epiursolic acid, 3EA)、熊果酮酸 (ursolic acid, UA) 与齐墩果酮酸 (oleanonic acid, OA)

对蛋白 NEDD8 修饰表现出稳定且显著的抑制作用 (图 1D)。

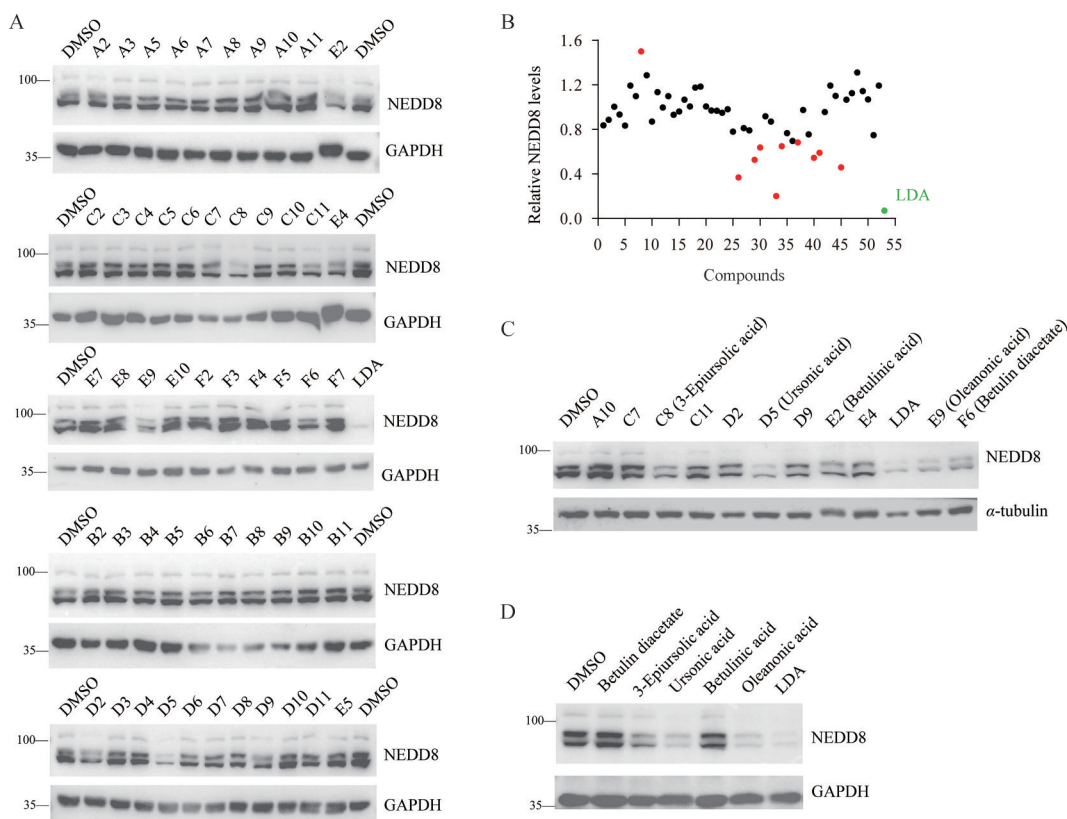
## 2 齐墩果酮酸选择性抑制 Cullin 家族蛋白的 NEDD8 修饰

为进一步研究这 3 个小分子的作用, 本研究检测了它们对 NEDD8 修饰抑制的剂量依赖性, 结果显示, 熊果酮酸和齐墩果酮酸在  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内几乎清除了所有的 NEDD8 修饰, 3-表熊果酸在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内几乎清除了所有的 NEDD8 修饰。由于 Cullin 蛋白是细胞内最为主要的 NEDD8 修饰底物, 本研究进一步探究了这 3 个小分子对 Cullin 家族蛋白的 NEDD8 修饰的调控作用, 结果表示, 3-表熊果酸在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  诱导 NEDD8 修饰的 Cullin5 转换为其未修饰形式, 熊果酮酸在  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  诱导 NEDD8 修饰的 Cullin2 和 Cullin5 转换为其未修饰形式, 需要注意的是, 齐墩果酮酸诱导 NEDD8 修饰的 Cullin1、Cullin2 和 Cullin5 转换为其未修饰形式 (图 2A)。综上, 齐墩果酮酸不仅对细胞内总 NEDD8 的清除效果最强, 且对 Cullin 的 NEDD8 修饰的调控作用也是最为显著的, 因此本研究选取齐墩果酮酸作为后续研究的主要对象。鉴于前期课题组验证

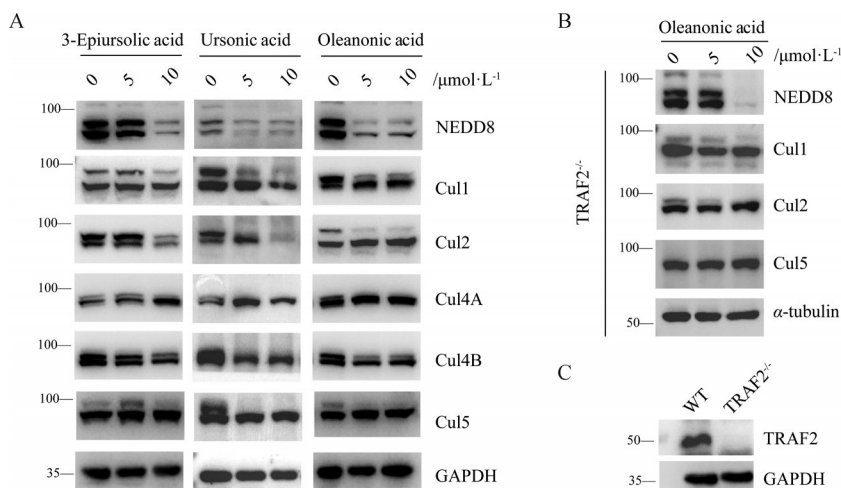
了路路通酸是通过靶向 TRAF2 调控 Cullin NEDD8 修饰<sup>[14]</sup>, 因此进一步验证齐墩果酮酸对总蛋白 NEDD8 修饰的调控是否依赖于 TRAF2, 结果发现, TRAF2 的缺失只能减缓齐墩果酮酸  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对总蛋白 NEDD8 修饰的抑制作用, 但不能阻断其  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对总蛋白 NEDD8 修饰的抑制作用。这提示可能有其他蛋白参与了齐墩果酮酸对 Cullin NEDD8 修饰的抑制 (图 2B、C)。

## 3 齐墩果酮酸选择性与 TRAF 家族蛋白 TRAF1 结合

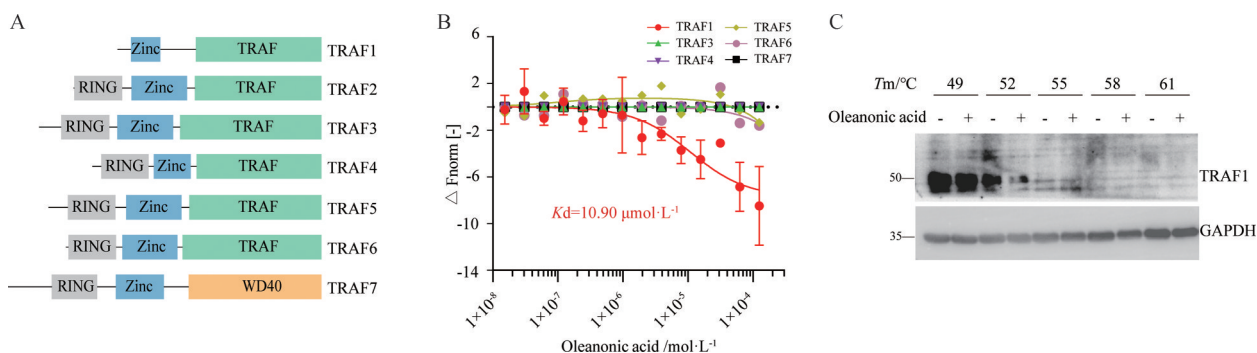
哺乳动物的 TRAF 家族有 7 个成员: TRAF1~TRAF7。在结构上, 它们主要由一个高度保守的 TRAF 结构域、一个位于 N 末端的 RING-finger 结构域和几个连续的锌指结构域构成 (图 3A)<sup>[14]</sup>。前期课题组已经验证了齐墩果酮酸不与 TRAF2 结合<sup>[15]</sup>, 因此, 本研究利用 MST 技术<sup>[16]</sup>, 检测齐墩果酮酸与除了 TRAF2 外的其他 TRAF 家族蛋白的关系。在人胚胎肾细胞 293T 细胞中过表达 TRAF 家族蛋白后, 裂解细胞制备裂解液, 经齐墩果酮酸孵育 1~3 min 后通过 MST 进行检测, 结果表明, 齐墩果酮酸能够特异性地与 TRAF1 结合, 其与 TRAF1 结合亲和力为  $10.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 3B)。



**Figure 1** Screening of liquidambaric acid (LDA) analogues based on NEDD8 modification. A, B: In HCT116 cells, the protein NEDD8 modification level of 52 LDA analogs was treated for 24 h (A), and a scatter plot was drawn from this (B); C: In HCT116 cells, the protein NEDD8 modification level after 24 h of treatment with 12 candidate small molecules; D: In HCT116 cells, the protein NEDD8 modification level after 24 h of treatment with 5 candidate small molecules



**Figure 2** LDA analogues selectively inhibit Cullin NEDD8 modification. A: The NEDD8 modification level of protein in HCT116 cells after treatment with 3-epiursolic acid, ursonic acid and oleanonic acid for 24 h at 0, 5, and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; B: In TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) knockout HCT116 cells, the NEDD8 modification level of protein was treated with oleanonic acid of 0, 5, and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; C: Verification of TRAF2 knockout HCT116 cells



**Figure 3** Validation of oleanonic acid targeting TRAF1. A: Schematic diagram of TRAF family domain; B: Microscale thermophoresis (MST) was used to detect the binding of oleanonic acid to TRAF family proteins in HEK293T cells. TRAF1 incubation fitted the curve with a  $K_d$  value of  $10.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n = 3$ ); C: Cellular thermal shift assay (CETSA) was used to detect the changes of TRAF1 protein levels in SW480 cells after treatment with oleanonic acid  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 1 h

本研究进一步对活细胞中齐墩果酮酸与 TRAF1 的结合作用进行 CETSA 检测。CETSA 是基于配体分子与靶蛋白结合可改变其热力学稳定性从而反映两者结合情况的一种技术<sup>[17]</sup>。结果发现, 齐墩果酮酸能显著改变 TRAF1 的热稳定性 (图 3C)。综上, 齐墩果酮酸能够与 TRAF1 直接结合。

#### 4 齐墩果酮酸调控 TRAF1 与 NEDD8 修饰通路蛋白互作

课题组前期已鉴定 TRAF2 可与 NEDD8 修饰复合物直接互作<sup>[18]</sup>, 因此, 本研究进一步考察 TRAF1 与 NEDD8 修饰复合物的作用, 以及齐墩果酮酸对其调控作用。首先利用 PLA 检测 TRAF1 与 NEDD8 及其修饰系统的相互作用及齐墩果酮酸对其调控作用。PLA 技术可实现对内源性多组蛋白间的相互作用的可视化研究<sup>[19]</sup>。结果发现, TRAF1 与 NEDD8 本身具有相互作用,

且齐墩果酮酸不改变 TRAF1 与 NEDD8 的互作 (图 4A)。进一步考察了 TRAF1 和 NEDD8 修饰系统中 E2 酶 (UBC12)、E3 酶 (RBX1) 与底物 (Cullin1) 的互作, 结果发现, 齐墩果酮酸显著减弱 TRAF1 与 UBC12 及 RBX1 的相互作用, 值得注意的是, 齐墩果酮酸显著增强 TRAF1 与 Cullin1 的相互作用 (图 4B)。此外, 本研究进一步排除齐墩果酮酸调控 Cullin1 作用是否依赖于 TRAF2, 结果表示, 齐墩果酮酸不改变 TRAF1 与 TRAF2 的互作 (图 4C)。

除 TRAF1 与 NEDD8 系统的互作外, 本课题组还研究了齐墩果酮酸对 NEDD8 修饰酶之间互作的影响。结果显示, 齐墩果酮酸显著抑制 Cullin1 与 E2 酶 UBC12 的相互作用, 显著增强 Cullin1 与 E3 酶 RBX1 的相互作用, 显著增强 E2 酶 UBC12 与 E3 酶 RBX1 的互作 (图 4D)。以上结果表明, 齐墩果酮酸通过影响

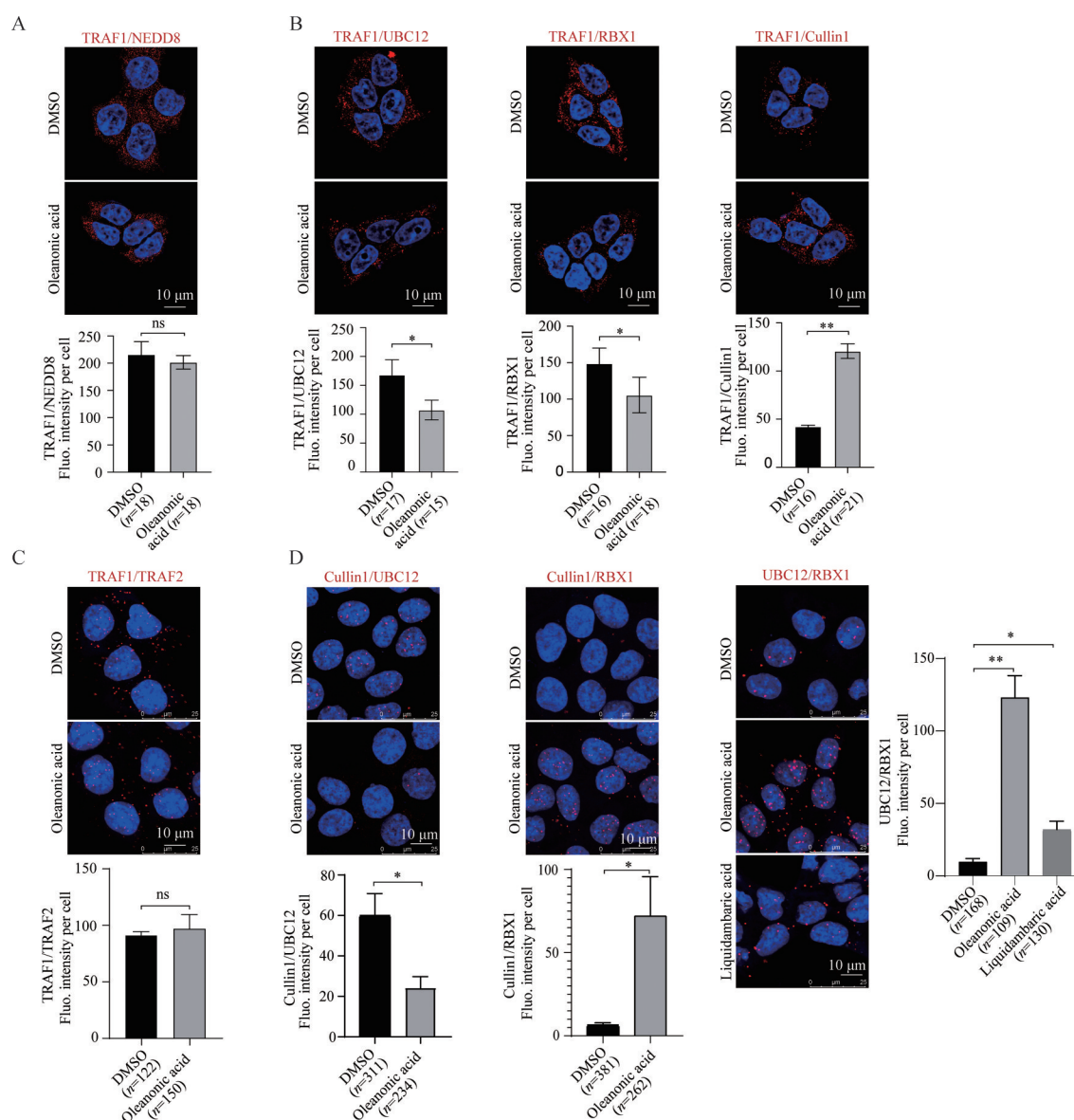
Cullin1 复合体的组装, 以及抑制 Cullin1 与 UBC12 互作来抑制 NEDD8 在级联酶上的传递, 进而抑制 Cullin 的 NEDD8 修饰。

## 讨论

本研究发现, 齐墩果酮酸能够显著且稳定地抑制细胞内总 NEDD8 修饰及特异性 Cullin1/2/5 NEDD8 修饰, 其机制是通过特异性靶向 TRAF1, 并通过增强 TRAF1 与底物 Cullin1 相互作用, 减弱 TRAF1 与 E2 酶

UBC12 以及 E3 酶 RBX1 的相互作用, 以此调控 NEDD8 修饰系统。重要的是, 齐墩果酮酸能够显著抑制 Cullin1 与 UBC12 的相互作用, 从而抑制 NEDD8 从 E2 酶传递到底物上。此外, 齐墩果酮酸能显著增强 Cullin1 与 RBX1 的相互作用, 以及显著增强 UBC12 与 RBX1 的互作, 以此影响 Cullin1 复合体的组装, 进一步调控 Cullin 的 NEDD8 修饰。

值得注意的是, 与齐墩果酮酸选择性抑制 Cullin1/2/5 NEDD8 修饰不同, 路路通酸选择性抑制 Cullin2/5



**Figure 4** Oleanonic acid regulates the interaction between TRAF1 and NEDD8 modified pathway proteins. A: The interaction between TRAF1 and NEDD8 in HCT116 cells treated with oleanonic acid ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h was detected by proximity ligation assay (PLA) and the results were statistically analyzed; B: The interaction between TRAF1 and UBC12, RBX1, Cullin1 in HCT116 cells treated with oleanonic acid ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h was detected by PLA and the results were statistically analyzed; C: The interaction between TRAF1 and TRAF2 in HCT116 cells treated with oleanonic acid ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h was detected by PLA and the results were statistically analyzed; D: The interaction between Cullin1 and UBC12, Cullin1 and RBX1, UBC12 and RBX1 in HCT116 cells treated with oleanonic acid ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h was detected by PLA and the results were statistically analyzed. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . Scale bar:  $10 \mu\text{m}$

的NEDD8修饰<sup>[19]</sup>。在机制上, 路路通酸是通过特异性靶向TRAF2调控NEDD8修饰系统, 而齐墩果酮酸是通过特异性靶向TRAF1调控NEDD8修饰系统。有趣的是, 与齐墩果酮酸抑制底物Cullin1与UBC12互作来抑制NEDD8传递不同的是, 路路通酸不改变底物Cullin2与UBC12的互作, 而是通过抑制UBC12与E1酶NAE互作来阻断Cullin2类泛素化。

综上, 本研究得出一个可能的作用模型: 中药活性小分子齐墩果酮酸通过靶向TRAF1, 增加TRAF1/Cullin1的互作, 减弱TRAF1/UBC12与TRAF1/RBX1的相互作用, 增强RBX1/UBC12的互作, 推测齐墩果酮酸可能改变TRAF1的构象, 使其与Cullin1结合增强, 产生空间位阻效应, 使UBC12/RBX1联系更加紧固, 因此进一步导致Cullin1/UBC12的互作减少, 由此NEDD8由E2向E3的传递减少, 最终抑制Cullin NEDD8修饰, 但该模型今后还需要进一步的研究和验证。

**作者贡献:** 张雪和张议元负责课题总体设计; 张议元、王甜甜、徐宇、王子叶、程石负责完成实验的具体实施; 张雪和张议元负责实验数据分析、文章撰写; 屈祎和张雪对课题进行及论文撰写进行指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Leutert M, Entwisle SW, Villén J. Decoding post-translational modification crosstalk with proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100129.
- [2] Walden H, Podgorski MS, Huang DT, et al. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1 [J]. *Mol Cell*, 2003, 12: 1427-1437.
- [3] Huang DT, Paydar A, Zhuang M, et al. Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1 [J]. *Mol Cell*, 2005, 17: 341-350.
- [4] Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, et al. E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification [J]. *Mol Cell*, 2009, 33: 483-495.
- [5] Kamura T, Conrad MN, Yan Q, et al. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2 [J]. *Genes Dev*, 1999, 13: 2928-2933.
- [6] Zhang S, Yu Q, Li Z, et al. Protein neddylation and its role in health and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9: 85.
- [7] He ZX, Yang WG, Zengyangzong D, et al. Targeting cullin neddylation for cancer and fibrotic diseases [J]. *Theranostics*, 2023, 13: 5017-5056.
- [8] Baek K, Krist DT, Prabu JR, et al. NEDD8 nucleates a multivalent cullin-RING-UBE2D ubiquitin ligation assembly [J]. *Nature*, 2020, 578: 461-466.
- [9] Short NJ, Muftuoglu M, Ong F, et al. A phase 1/2 study of azacitidine, venetoclax and pevonedistat in newly diagnosed secondary AML and in MDS or CMML after failure of hypomethylating agents [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16: 73.
- [10] Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer [J]. *Nature*, 2009, 458: 732-736.
- [11] Handa H, Cheong JW, Onishi Y, et al. Pevonedistat in East Asian patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes: a phase 1/1b study to evaluate safety, pharmacokinetics and activity as a single agent and in combination with azacitidine [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15: 56.
- [12] Shah JJ, Jakubowiak AJ, O'Connor OA, et al. Phase I study of the novel investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor pevonedistat (MLN4924) in patients with relapsed/refractory multiple myeloma or lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 34-43.
- [13] Mao H, Sun Y. Neddylation-independent activities of MLN4924 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1217: 363-372.
- [14] Park HH. Structure of TRAF family: current understanding of receptor recognition [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1999.
- [15] Yan R, Zhu H, Huang P, et al. Liquidambaric acid inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and colon cancer *via* targeting TNF receptor-associated factor 2 [J]. *Cell Rep*, 2022, 38: 110319.
- [16] Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, et al. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis [J]. *Nat Commun*, 2010, 1: 100.
- [17] Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, et al. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2100-2122.
- [18] Wang T, Zhang Q, Xu Y, et al. TRAF2 associates with Cullin NEDDylation complex assembly [J]. *FEBS J*, 2024, 291: 4473-4488.
- [19] Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation [J]. *Nat Methods*, 2006, 3: 995-1000.